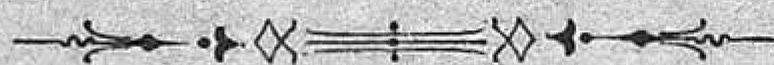
RIVISTA SPERIMENTALE DI FRENIATRIA
Direttore: A. TAMBURINI
VOL. XXXII. FASC. I.-II.

Istituto psichiatrico di Reggio-Emilia

SUL CICLO BIOLOGICO DEI PENICILLI VERDI

IN RAPPORTO COLL' ENDEMIA PELLAGROSA

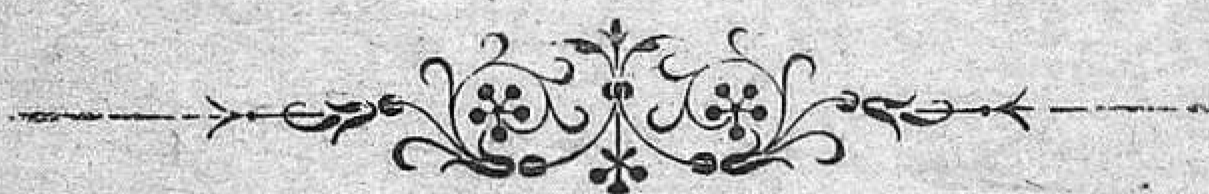
e con speciale riguardo alla loro attività tossica nelle varie stagioni dell'anno



III.ª NOTA

DEL

Dott. CARLO CENI
DIRETTORE DEI LABORATORI SCIENTIFICI



(Con una Tavola)

REGGIO-EMILIA
TIPOGRAFIA DI STEFANO CALDERINI E FIGLIO
1906.

RIVISTA SPERIMENTALE DI FRENIATRIA

Direttore: **A. TAMBURINI**

Vol. XXXII. Fasc. I.-II.

Istituto psichiatrico di Reggio-Emilia

SUL CICLO BIOLOGICO DEI PENICILLI VERDI

IN RAPPORTO COLL' ENDEMIA PELLAGROSA

e con speciale riguardo alla loro attività tossica nelle varie stagioni dell'anno

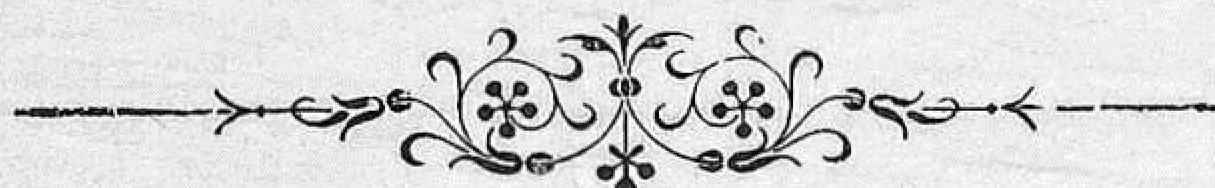


III.ª NOTA

DEL

Dott. CARLO CENI

DIRETTORE DEI LABORATORI SCIENTIFICI

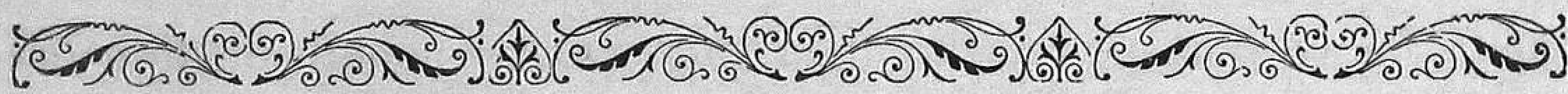


(Con una Tavola)

REGGIO-EMILIA

TIPOGRAFIA DI STEFANO CALDERINI E FIGLIO

1906.



Istituto psichiatrico di Reggio-Emilia

(616 $\frac{86}{969}$)

Tre anni or sono, pubblicando i risultati delle mie prime ricerche col D.r Besta sul valore patogeno dei Penicilli, dimostravo come anche questa specie di ifomiceti, analogamente agli Aspergilli, possa essere dotata di proprietà tossiche diverse ed opposte. Descrivevo infatti allora due varietà botaniche di *Penicillum Glaucum*, una capace di elaborare dei tossici di natura paralizzante e deprimente, e l' altra capace di elaborare invece dei tossici di natura eccitante e convulsivante, e richiamavo ancora l' attenzione sull' importanza di questo fatto nell' interpretazione etiologica delle varie forme cliniche della pellagra.

In seguito, in due comunicazioni successive fatte nel 1904-905, una al XII.° Congresso Freniatrico in Genova e l' altra al III.° Congresso della Società Italiana di Patologia in Roma, esponendo i risultati delle mie ulteriori ricerche, affermavo, in base a esperienze metodiche eseguite per circa due anni di seguito sopra oltre 60 campioni di Penicilli verdi e corrispondenti in gran parte ad altrettante varietà botaniche, che moltissimi di questi parassiti erano da considerarsi patogeni, dotati, cioè, di proprietà tossiche convulsivanti o deprimenti; mentre assai più limitato era il numero di quelli che si potevano chiamare innocui, cioè sprovvisti di ogni proprietà patogena.

In queste note preventive facevo però già osservare che il grado di tossicità dei tipi risultati patogeni era tutt' altro che

eguale e costante; giacchè non solo variava notevolmente da varietà a varietà, ma nelle singole varietà stesse variava ancora, e in modo assai accentuato, nei diversi periodi dell'anno. Il massimo grado di tossicità era raggiunto di solito da questi parassiti durante le stagioni calde in genere e più specialmente nella primavera; mentre durante le stagioni fredde questa proprietà di fabbricare dei tossici andava diminuendo assai, e in alcuni casi finiva per scomparire del tutto, non ostante che il mezzo di coltura fosse sempre rimasto il medesimo, e non ostante che questi ifomiceti venissero messi a sviluppare anche a una temperatura corrispondente al loro *optimum.*

Il rapporto tra il potere tossico dei parassiti in discorso e le varie epoche dell' anno corrispondeva quindi a un dipresso a quello che già avea prima osservato per l' *Aspergillus Fumigatus,* e perciò, in base a queste osservazioni preliminari, mi credetti fin d' allora autorizzato ad ammettere in termini generali che anche i Penicilli, come gli Aspergilli, vanno soggetti a una medesima legge biologica, propria degli esseri del regno a cui appartengono, cioè dei vegetali, i quali sono appunto regolati da un alternarsi di fasi di vita attiva e di vita latente; fasi che nei suddetti parassiti corrisponderebbero a una produzione massima e minima dei tossici specifici da loro elaborati.

Nell' ultima mia comunicazione a tale proposito, infine, facevo notare come queste fasi di *iper* e di *ipo-* attività tossica corrispondevano ancora, sebbene in modo non sempre ben definito, a delle modificazioni dei caratteri fisiologici più appariscenti, come p. e. del color del feltro e della superficie inferiore della patina, non che a variazioni della proprietà biochimica che molti dei Penicilli hanno di elaborare, contemporaneamente ai prodotti tossici, anche dei prodotti fenolici.

Nell' attuale memoria mi propongo ora di riassumere un po' più per esteso i risultati delle mie ricerche sui Penicilli verdi per ciò che riguarda le varie questioni sopra accennate e di far conoscere in modo particolare quanto fin quì mi è risultato sul ciclo biologico di questi ifomiceti in rapporto alle loro proprietà patogene.

Riporto quì il frutto di circa due anni di osservazioni eseguite metodicamente nelle diverse stagioni su 61 campioni di Penicilli verdi, molti dei quali corrispondono, ripeto, a varietà botaniche ben definite.

Questi Penicilli furono isolati, in parte da farine di *mais* e di frumento infette che servivano d' alimento quotidiano a diverse famiglie di pellagrosi, e in parte furono isolati dall' atmosfera degli ambienti, quasi sempre in condizioni oltremodo anti-igieniche e che costituivano l'abitazione delle stesse famiglie di pellagrosi.

La massima parte di questi Penicilli, cioè 53 campioni, furono isolati nei varî mesi del 1904 e in particolar modo durante la primavera ed estate; mentre gli altri 8 campioni furono isolati nei mesi di Febbraio e Marzo 1905.

La prima prova del potere patogeno fu sempre eseguita, per ogni singolo campione, pochi giorni dopo l'isolamento del parassita. In seguito le prove vennero poi ripetute metodicamente nelle varie stagioni successive, fino a tutto Novembre 1905; di modo che pei primi campioni l' osservazione dura da due anni, mentre che per quelli isolati per ultimo, l' osservazione dura da un sol anno circa.

Data la quantità non indifferente del materiale su cui mi ero prefisso di condurre questi studî, e le numerose ricerche che dovetti quindi compiere nei varî periodi dell'anno, non sempre mi fu possibile di ripetere tutte le esperienze in una determinata epoca, come era mio desiderio; ma dovetti spesso farle saltuariamente e non di raro a distanze considerevoli le une dalle altre. Ciò devesi ancora al fatto ch' io ero obbligato a tener conto anche dell' importanza dei risultati che ottenevo dai singoli casi, la quale spesso mi induceva a rifare un' esperienza anche a breve distanza dall' ultima, quando credevo necessario una pronta riconferma.

Con tutto ciò però dal complesso di queste mie numerose ricerche appare così sorprendente l' armonia e la costanza dei reperti ottenuti da ogni singolo campione, che sembrami di poter ormai escludere ogni dubbio sul valore dei fatti da me osservati, i quali vengono così una volta più a dimostrare la complessità dei fenomeni biologici di questi piccoli esseri vegetali.

I germi furono conservati su patate e su liquido Raulin facendo dei trapianti ogni 3-4 mesi. Per gli assaggi del potere tossico i parassiti venivan solo coltivati in capsule Thindal e su liquido Raulin, e tenuti a sviluppare alla temperatura ambiente nelle stagioni calde; mentre durante l' inverno l'esperienza veniva in generale riprodotta con germi tenuti a sviluppare alla temperatura costante di 17°-18°, che corrisponde appunto al loro *optimum*.

Durante l' inverno 1904-1905 però per la massima parte dei campioni le ricerche furono eseguite sia su parassiti fatti sviluppare alla suddetta temperatura costante, sia su parassiti fatti sviluppare a temperatura ambiente, e ciò anche per avere un criterio differenziale più esatto e per vedere fino a qual punto il diverso grado della temperatura in cui i germi si sviluppano possa avere importanza nei diversi ed opposti risultati che si ottengono nelle varie stagioni dell' anno [1].

I tossici poi, come al solito, furono estratti bollendo le patine in alcool, e raccogliendo il residuo con acqua; la prova del potere tossico di questo veniva fatta su cavie e su cani.

In media si inoculava l' estratto di $^1/_2$ patina per una cavia adulta del peso di circa 600 gr., mentre per 6-7 Kg. circa di peso di cane si inoculava l' estratto di una patina intera.

Solo nei casi in cui i risultati apparivano fin da principio molto netti, mi limitavo a compiere l' esperienza sopra un solo animale; mentre quando il risultato della prova riusciva un po' incerto, l' esperienza veniva subito ripetuta sopra due animali, cioè su due cavie o su una cavia e un cane.

Il complesso dei risultati di queste mie ricerche è ora tale che non mi è più possibile dividere i Penicilli in patogeni e non patogeni, e così pure non mi è più possibile di dividere le varietà patogene in quelle a tossici eccitanti e convulsivanti, e in quelle a tossici deprimenti e paralizzanti, come avea fatto fin quì in base ad osservazioni preliminari. E invero dalle ricerche continuate sono emersi nuovi fatti i quali, mentre servono a completare le nostre nozioni sulla biologia di questi esseri e a schiarire molte questioni che ricerche precedenti avean lasciato insolute, ci obbligano ancora a considerare questi parassiti, rispetto alle loro proprietà patogene, sotto un punto di vista assai più generico di quello che si poteva supporre.

Anzi tutto credo che, pel momento almeno, non sia più possibile ora parlare di varietà tossiche e varietà innocue, pel semplice fatto che molti campioni i quali per un periodo di più mesi ed anche di un anno e più, erano rimasti innocui, privi cioè della proprietà di elaborare dei tossici sia convulsivanti, sia

[1] Notisi che il materiale per le seminagioni quasi sempre era preso da colture su patate fatte in primavera o in autunno, perchè più adatte per la loro abbondante sporificazione; di modo che di solito una medesima coltura ha servito per più esperienze eseguite nelle varie epoche dell' anno.

deprimenti, apparvero in seguito dotati delle proprietà tossiche più tipiche; mentre invece altri campioni rimasti patogeni per un periodo anche di circa due anni diventarono in seguito innocui.

Nelle ripetute prove sul potere tossico di questi 61 campioni di Penicilli uno solo poi è risultato finora costantemente sprovvisto del tutto o quasi di qualsiasi proprietà tossica; mentre tutti gli altri, ora in un' epoca, ora nell' altra, e dopo fasi più o meno lunghe di inattività tossica, apparvero dotati delle loro tipiche proprietà patogene. Non credo perciò imprudente di affermare fin d' ora che assai probabilmente tutti, o la massima parte almeno dei Penicilli verdi posson esser considerati patogeni; nello stesso modo che tutti o la maggior parte di essi, pur vegetando rigogliosi, in altri periodi possono essere considerati innocui, come vedremo più avanti.

Come non ci è più possibile dividere questi ifomiceti in varietà patogene e in varietà innocue, essendo tutti egualmente patogeni; così non ci è neppure più possibile dividerli in varietà dotate di proprietà tossiche deprimenti e paralizzanti e in varietà dotate di proprietà tossiche eccitanti e convulsivanti; giacchè è risultato inoltre, pure in modo evidente e indiscutibile, che una medesima varietà può, alternativamente e a periodi di distanza più o meno lunghi, elaborare ora dei tossici di natura eccitante e convulsivante, ora dei tossici di natura deprimente e paralizzante, come già ho dimostrato per la nuova specie di *Aspergillus Varians* da me descritta di recente.

Si tratta invece assai probabilmente di fasi speciali di attività tossica inerenti al ciclo biologico di questi parassiti, almeno da quanto ora si vedrà riassumendo queste ricerche; fasi che meritano certo di essere studiate sia per la loro importanza scientifica, sia perchè forse ci potranno anche essere di guida nell' interpretazione di molti fatti ancora oscuri che caratterizzano l' evoluzione e il diffondersi nell' endemia pellagrosa.

Data la natura dei nostri nuovi reperti, per dare un resoconto esatto di queste ricerche, non mi resterebbe ora che di descrivere le esperienze eseguite metodicamente per ogni singolo campione o varietà di Penicilli verdi da me studiati, incominciando dal momento in cui questi vennero isolati; giacchè solo l'esame minuzioso dei risultati ottenuti da queste numerose esperienze ci potrà dare un' idea esatta del potere patogeno dei suddetti parassiti sia rispetto al loro ciclo biologico annuale, sia

rispetto alle condizioni della località e ambiente in cui furono riscontrati, sia ancora rispetto alle sostanze alimentari dalle quali vennero isolati.

Siccome però è mia intenzione di rimandare a epoca più remota l' esposizione completa e dettagliata di questi studi, e ciò per comprendere un periodo di osservazione più lungo che mi sarà possibile; così ora mi limiterò ad alcune considerazioni d' indole generica per quanto riguarda le varie questioni sopra accennate, e riassumerò infine un po' per esteso i risultati delle esperienze eseguite con quattro varietà di Penicilli, bastandomi per ora di dare un concetto sulle principali variazioni che sono avvenute nelle proprietà patogene di questi ifomiceti nel periodo di circa 2 anni di osservazioni.

Per ciò che riguarda lo stato patogeno dei singoli Penicilli riscontrato al momento in cui vennero isolati, debbo anzi tutto far osservare che non di raro si ebbe a constatare delle notevoli diversità in rapporto alle stagioni dell' anno, e più ancora in rapporto alle diverse località pellagrogene in cui furono praticate le ricerche.

In quanto alle stagioni dell' anno dirò solamente che di regola ordinaria furono tosto riscontrati provvisti di proprietà patogene i Penicilli isolati durante le stagioni calde in genere e più precisamente nella primavera inoltrata e nel principio dell'autunno; mentre invece durante le stagioni fredde, e più propriamente nell' inverno, non che in sul principio della primavera, i campioni isolati apparvero a quell' epoca, e in modo prevalente, o affatto innocui, oppure provvisti di un potere tossico assai debole.

Riguardo alla natura dei tossici dei Penicilli, riscontrata all' epoca in cui questi furono isolati, posso pure fin d'ora affermare che mentre nelle stagioni fredde dell' anno prevalsero di solito i tossici a carattere deprimente e paralizzante, invece nelle stagioni calde prevalsero quelli a carattere eccitante e convulsivante. Questa prevalenza devesi a ogni modo ritenere in termini molto generali; perchè, come si vedrà nel lavoro completo, le due suddette proprietà tossiche diverse ed opposte si possono riscontrare in parassiti al momento in cui vengono isolati in qualsiasi epoca dell'anno, tanto, cioè, nelle stagioni fredde quanto in quelle calde; nello stesso modo che in qualsiasi stagione dell' anno si possono isolare dei parassiti perfettamente innocui.

Ancora più marcate, come dissi, apparvero queste diversità del potere patogeno dei Penicilli al momento in cui furono isolati rispetto alle località, alle diverse zone pellagrogene in cui furono rinvenuti. Sull' alto Apennino della Provincia di Reggio-Emilia, p. es., nelle stagioni calde prevalsero assai di più le forme patogene alle forme innocue; mentre invece in altre zone non montuose, ma della stessa Provincia, nella medesima stagione prevalsero le forme innocue alle patogene. Simili diversità e spesso anche più notevoli, furono riscontrate non di raro anche tra parassiti isolati in punti diversi di una stessa zona pellagrogena, ma di ciò mi occuperò più a lungo in nota speciale sulla diffusione dell' endemia pellagrosa.

Invece, finora almeno, non ho potuto osservare alcun rapporto fra le proprietà patogene possedute dal parassita al momento del suo isolamento e la natura del materiale infetto da cui proveniva e che serviva di alimentazione alle famiglie dei pellagrosi.

Così furono riscontrati Penicilli che presentarono tosto tipiche proprietà tossiche convulsivanti oppure deprimenti, tanto p. es. nelle farine di *mais,* quanto nelle farine di frumento; come nelle une e nelle altre furono riscontrati, senza diversità alcuna, dei Penicilli affatto innocui.

Le variazioni consistevano in questi casi invece nel numero dei parassiti e nelle specie dei medesimi; ma anche questa questione formerà pure oggetto del suddetto prossimo lavoro sulla diffusione dell' endemia pellagrosa, nel quale appunto dimostrerò come esistano delle vere flore speciali di questi parassiti vegetali in rapporto alle diverse zone pellagrogene.

Essendo lo scopo principale di questa nota di dare un' idea generale delle variazioni che avvengono nel potere patogeno dei Penicilli indipendentemente dal materiale nutritivo in cui si sviluppano, ma legate, come si vedrà, a condizioni esteriori in parte note e in parte a noi ancora del tutto sconosciute, riassumo qui per ora in breve il risultato delle mie ricerche su quattro delle varietà che furono oggetto di metodiche osservazioni per un periodo di circa due anni. Queste quattro varietà corrispondono rispettivamente ai N. 5, 6, 7 e 27 della mia collezione di Penicilli verdi, e di esse la I. al momento in cui fu isolata presentava proprietà tossiche deprimenti e paralizzanti, la II. presentava proprietà tossiche eccitanti e convulsivanti, mentre la III. e la IV. apparivano completamente innocue.

Nell' esporre i risultati delle proprietà tossiche delle singole esperienze eseguite nelle diverse epoche durante il 1904 e il 1905, accennerò anche alle condizioni di alcuni caratteri fisiologici principali dei quali ho creduto opportuno di tener conto in queste osservazioni; vale a dire, accennerò ai colori tipici del feltro e della superficie inferiore della patina, all' odore emanato non che alla proprietà o no che hanno questi Penicilli di elaborare dei prodotti fenolici *, meritando pure le variazioni che si osservano anche in questi caratteri del parassita d'esser fin d'ora conosciute, perchè non di raro in intimo rapporto col suo potere patogeno.

Nell' esporre i risultati delle esperienze, per esser breve, accennerò solamente all' esito definitivo dell' iniezione del tossico nell' animale, ricordando qui ancora una volta per sempre che a una cavia di 600 gr. circa inoculavo l' estratto di $^1/_2$ patina (ottenuta in capsule Thindal), cioè 7 cc. di una soluzione acquosa, giacchè il residuo dell' estratto alcoolico per ogni patina veniva raccolto con 14 cc. di acqua; mentre per ogni 6-7 Kg. di cane inoculavo l' estratto di una patina, cioè 14 cc. di una soluzione acquosa del residuo stesso. L' estrazione del tossico di solito si faceva all' 8.° giorno di sviluppo della patina, quando il germe almeno presentava uno sviluppo normale e rapido. Nei casi in cui lo sviluppo era lento, specialmente nell' inverno, per l' estrazione del tossico si attendeva che la patina avesse raggiunto il massimo sviluppo, il quale avveniva di solito 7-8 giorni più tardi che nei primi casi.

VARIETÀ I. - Penicillo isolato il 5 *Maggio* 1904; coltivato subito dopo su liquido Raulin dà una patina con feltro di color verde cinereo e colla superfice inferiore di color giallo arancio chiaro. Fonde la gelatina assai lentamente.

1. ESPERIENZA - 25 *Maggio* 1904.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo normale e rapido; odor di muffa forte; feltro di color verde cinereo lievemente giallo e con superficie inferiore color limone chiaro.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

* La ricerca dei composti fenolici fu eseguita solo mediante la classica reazione al cloruro di ferro suggerita dal Gosio e col metodo modificato dal Di-Pietro. I miei reperti quindi in proposito riguardano esclusivamente i composti dimostrabili colla suddetta reazione.

Cane di 7 Kg: inoculato, muore dopo 3 ore con gravissimi fenomeni di depressione.

Autopsia: intensa congestione di tutti gli organi, specialmente del peritoneo che presenta inoltre emorragie multiple.

2. ESPER. - 27 *Maggio* 1904.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo normale e rapido; odor di muffa forte; feltro di color verde cinereo lievemente giallo e con superficie inferiore di color limone chiaro.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cavia di 650 gr.: inoculata, muore dopo 2 ore con gravissimi fenomeni di depressione.

3. ESPER. - 24 *Giugno* 1904.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo normale e rapido: odor lieve di muffa; feltro di color verde cinereo chiaro lievemente giallo e con superficie inferiore giallo arancio scuro.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cane di 15 Kg.: poco dopo iniettato presenta lievi fenomeni di depressione, sonnolenza ecc. e poi dopo 24 ore si rimette.

4. ESPER. - 30 *Luglio* 1904.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo normale e rapido; odor di muffa; feltro di color verde scuro; superficie inferiore di color giallo limone.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cane di 6500 gr.: iniettato, presenta gravissimi fenomeni di depressione e muore dopo 2 ore.

Autopsia: intensa congestione del peritoneo con diffusi focolai emorragici e con 150 cc. di essudato peritoneale siero sanguinolento.

5. ESPER. - 1 *Ottobre* 1904.

Patina cresciuta a temperat. ambiente: sviluppo più lento del solito; odor lieve di muffa; feltro di color verde cinereo scuro bleuastro; superficie inferiore giallo chiaro.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cavia di 700 gr: iniettata, muore dopo 2 ore con gravi fenomeni di depressione.

Autopsia: lieve congestione del peritoneo.

6. ESPER. - 20 *Novembre* 1904.

Patina cresciuta a temp. costante di 18°: sviluppo normale e rapido; odor forte di muffa; feltro verde chiaro cinereo; superficie inferiore giallo chiaro.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cane di 6 Kg.: presenta tremori diffusi e intensi e gli arti fortemente spastici; entra presto in stato comatoso, e muore 3 ore dopo l' iniezione.

Autopsia: cangestione mediocre del peritoneo.

Cavia di 670 gr.: presenta qualche lieve tremore diffuso e muore con gravi fenomeni di depressione 2 ore dopo l' iniezione.

7. Esper. - 16 *Dicembre* 1904.

Patina cresciuta a temperatura costante di 18°: sviluppo normale e rapido; odor forte di muffa; feltro verde chiaro cinereo; superficie inferiore giallo chiaro.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cavia 790 gr.: muore con gravissimi fenomeni di depressione dopo 3 ore.

8. Esper. - 27 *Gennaio* 1905.

a) Patina cresciuta a temperatura costante di 18°: sviluppo normale e rapido; odore lieve di muffa; feltro verde cinereo chiaro; superfice inferiore giallo scuro.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cavia 1.ª di 650 gr. - lievi fenomeni di depressione e muore 3 giorni dopo l' iniezione.

Cavia 2.ª di 600 gr. - presenta lievi fenomeni di depressione e poi si rimette.

b) Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo assai lento, ma completo; odor lieve di muffa; feltro verde cinereo chiaro; superficie inferiore giallo nerastro.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cavia 1. di 550 gr.: nessun fenomeno di intossicamento.

Cavia 2. di 660 gr.: nessun fenomeno di intossicamento.

9. Esper. - 9 *Febbraio* 1905.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo lento ma completo; quasi inodora; feltro di color cinereo e superfice inferiore color rosso mattone.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cane di 12 Kg.: non presenta alcun fenomono di intossicamento.

10. Esper. - 6 *Aprile* 1905.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo lento e normale; odor lieve di muffa; feltro verde cinereo chiaro; superficie inferiore giallo chiaro.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cavia 550 gr.: nessun fenomeno di intossicamento.

11. Esper. - 25 *Aprile* 1905.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo lento e normale; odor lieve di muffa; feltro verde cinereo chiaro; superficie inferiore giallo chiaro.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cane di 7.500 Klg.: nessun fenomeno di intossicamento.

12. Esper. - 1 *Giugno* 1905.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo rapido e normale; odor forte di muffa; feltro verde grigio giallastro; superficie inferiore giallo pagliarino.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cane di 7800 gr. muore dopo 6 ore con gravissimi fenomeni di depressione e con diarrea sanguinolenta.

Autopsia: intensa congestione di tutti gli organi interni, specialmente del peritoneo e intestino.

13. Esper. - 16 *Giugno* 1905.

Patina a temperatura ambiente: sviluppo rapido e normale; odor forte di muffa; feltro verde grigio giallastro; superficie inferiore giallo pagliarino.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cane 9500 gr. muore dopo 5 ore con gravissimi fenomeni di depressione.

Autopsia: intensa congestione di tutti gli organi interni, specialmente del peritoneo e intestino.

14. Esper. - 25 *Agosto* 1905.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo rapido e normale; odor di muffa; feltro verde scuro giallastro; superficie inferiore giallastra.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cane di 4500 gr.: presenta tremori diffusi e intensi, convulsioni tetaniformi gravi e frequenti scariche diarroiche: tali fenomeni durano 3 giorni, alla fine dei quali l' animale muore.

Autopsia: congestione di tutti gli organi interni, specialmente dell' intestino.

15. Esper. - 30 *Agosto* 1905.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo rapido e normale; odor di muffa; feltro verde scuro giallastro: superficie inferiore giallastra.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cavia di 700 gr.: tremori e convulsioni tetaniformi tipiche che durano 14 ore; segue stato comatoso e morte 16 ore dopo l'iniezione.

16. Esper. - 15 *Settembre* 1905.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo rapido e normale; odor di muffa; feltro verde cinereo scuro; superficie inferiore bianca.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cavia di 850 gr.: tremori e convulsioni tetaniformi e tipiche; morte dopo 4 giorni.

17. Esper. - 22. *Novembre* 1905.

Patina cresciuta a 18°: sviluppo normale e rapido; odor di muffa penetrante; feltro verde grigio celeste; superficie inferiore giallo cromo chiaro.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cavia di 750 gr.: muore 16 ore dopo l'iniezione con gravi fenomeni di depressione.

Varietà II. - Penicillo isolato il 5 *Maggio* 1904. Coltivato subito dopo l'isolamento in liquido di Raulin dà una patina con feltro di color verde celeste iridescente e colla superficie inferiore di color rosso mattone scuro. Fonde la gelatina assai rapidamente.

1. Esperienza - 25 *Maggio* 1904.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo rapido e normale; odor fortissimo di muffa; feltro di color verde celeste iridescente; superficie inferiore rosso mattone scuro.

Estratto alcoolico: reazione fenolica traccie.

Cane di 6 Kg.: tremori e convulsioni tetaniformi gravi che durano circa tre giorni; segue stato comatoso e morte 6 giorni dopo l'iniezione.

Autopsia: Lieve stato di congestione degli organi interni.

2. Esper. - 24 *Giugno* 1904.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo rapido e normale; odor fortissimo di muffa; feltro di color verde celeste iridescente; superficie inferiore rosso mattone scuro.

Estratto alcoolico: reazion fenolica nulla.

Cane di 15 Kg.: tremori diffusi e convulsioni tetaniformi gravi e tipiche che durano 4 giorni di fila; segue stato comatoso e la morte 7 giorni dopo l'iniezione.

Autopsia: lieve congestione degli organi interni.

3. Esper. - 29 *Ottobre* 1904.

Patina cresciuta a temp. ambiente: sviluppo lento, ma completo; odor di muffa; feltro verde cinereo; superficie inferiore color castagno.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cane di 7 Kg.: lievi tremori diffusi e arti spastici. Tali fenomeni durano 2 giorni; in seguito l'animale mangia e beve e si rimette del tutto.

4. Esper. - 31 *Ottobre* 1904.

Patina cresciuta a temp. ambiente: sviluppo lento, ma completo; odor di muffa; feltro verde cinereo; superficie inferiore color castagno.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cane di 6500 gr.: tremori lievi e diffusi, ma senza fenomeni tetaniformi; morte 20 ore dopo l'iniezione.

Autopsia: congestione intensa del peritoneo e intestino; scarso essudato peritoneale siero sanguinolento.

Cavia 2. di 720 gr.: tremori lievi e diffusi; morte in stato comatoso 40 ore dopo l' iniezione.

5. Esper. - 20 *Novembre* 1904.

Patina cresciuta a 18°: sviluppo lento; tenue odor di muffa; feltro verde cinereo chiaro; superficie inferiore color ruggine.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cavia di 750 gr.: tremori diffusi assai lievi; stato di depressione grave; morte 37 ore dopo l' iniezione.

Autopsia: congestione intensa del peritoneo e intestino.

6. Esper. - 16 *Dicembre* 1904.

Patina cresciuta a 18°: sviluppo assai lento; tenue odor di muffa, feltro grigio chiaro con chiazze bianche; superficie inferiore di color rosso vinoso, carnosa.

Estratto alcoolico: reazione fenolica traccie.

Cavia 1. di 680 gr. Nessun fenomeno di intossicamento.

Cavia 2. 500 di gr. Nessun fenomeno di intossicamento.

7. Esper. - 7 *Febbraio* 1905.

a) Patina cresciuta a 18°: sviluppo lento; tenue odor di muffa; feltro grigio chiaro con chiazze bianche; superficie inferiore di color rosso-vinoso.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cavia 1. di 760 gr.: muore dopo 20 ore con fenomeni dei depressione.

Cavia 2. di 500 gr.: muore dopo 12 ore con fenomeni di depressione.

Autopsia: Congestione intensa del peritoneo e intestino.

b) Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo lentissimo, ma completo; lievissimo odor di muffa; feltro grigio chiaro con macchie giallastre; superficie inferiore di color giallo rossastro.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cavia 1. di 860 gr.: muore con fenomeni di depressione dopo 4 giorni.

Cavia 2. di 420 gr.: muore con fenomeni di depressione dopo 14 ore.

Autopsia: Congestione intensa del peritoneo e intestino.

8. Esper. - 6 *Aprile* 1905.

Patina cresciuta a 18°: sviluppo lento e incompleto: aspetto carnoso; odor di muffa; feltro grigio chiaro con macchie giallastre; superficie inferiore di color rossiccio scuro.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cavia 1. di 700 gr.: Nessun fenomeno di intossicamento.

Cavia 2. di 650 gr.: Nessun fenomeno di intossicamento.

9. Esper. - 1 *Giugno* 1905.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo un pò lento, ma normale; odor lieve di muffa; feltro verde grigio scuro; superficie inferiore color caffè scuro.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cane di 7. Kg.: tremori diffusi tipici, ma non gravi e senza gli accessi tetaniformi; arti spastici. Dopo 24 ore circa l' animale si rimette quasi del tutto.

Cavia di 600 gr.: qualche lievissimo tremore diffuso con fenomeni di depressione che scompaiono dopo 24 ore circa.

10. Esper. - 3 *Luglio* 1905.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo lento e incompleto; lieve odor di muffa; feltro verde chiaro con chiazze bianche; superficie inferiore di color bianco sporco con macchie gialle.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cavia 1. di 560 gr.: lievissimi tremori che scompaiono dopo 5 ore.

Cavia 2. di 700 gr.: lievissimi tremori che scompaiono dopo 2 ore.

11. Esper. - 25 *Agosto* 1905.

Patina cresciuta a temperatura ambiente; sviluppo lento; odor lieve di muffa: feltro verde chiaro con macchie bianche; superficie inferiore color castagno scuro.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cavia di 700 gr.: nessun fenomeno di intossicamento.

Cane di 6 Kg.: nessun fenomeno di intossicamento.

12. Esper. - 15 *Settembre* 1905.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo lento; inodora; feltro verde chiaro con chiazze bianche; superficie inferiore di color giallo nerastro.

Estratto alcoolico: reazione fenolica traccie.

Cavia di 700 gr.: nessun fenomeno di intossicamento.

13. Esper. - 25 *Novembre* 1905.

Patina cresciuta a 18°: sviluppo rapido e normale; odor lieve di muffa; feltro verde grigio giallastro; superficie inferiore di color rosso scuro.

Estratto alcoolico: reazione fenolica traccie.

Cavia di 800 gr.: muore con lievi fenomeni di depresssione progressiva dopo 4 giorni.

Autopsia: lieve congestione degli organi interni.

Varietà III. - Penicillo isolato il 6 Gennaio 1904 il quale, coltivato subito dopo l' isolamento, dà una patina con feltro verde scuro e colla superficie inferiore bianca; fonde la gelatina assai lentamente (quasi non fondente).

1. Esper. - 26 *Febbraio* 1904.

Patina cresciuta a 18°: sviluppo rapido e completo; odore di muffa; feltro di color verde scuro; superficie inferiore bianca.

Estratto alcoolico: reazione fenolica traccie.

Cavia di 600 gr.: non presenta alcun fenomeno di intossicamento.

2. Esper. - 7 *Marzo* 1904.

Patina cresciuta a 18°: - sviluppo rapido e completo; odore di muffa; feltro di color verde scuro; superficie inferiore bianca

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cavia di 700 gr.: nessun fenomeno di intossicamento.

3. Esper. - 4 *Maggio* 1904.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo rapido e completo; odor di muffa; feltro di colore verde scuro; superficie inferiore bianca.

Estratto alcoolico: reazione fenolica discreta.

Cane di 8400 gr.: nessun fenomeno di intossicamento.

4. Esper. - 11 *Agosto* 1904.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo rapidissimo; odor lieve di muffa; feltro di color grigio cinereo: superficie inferiore di color bianco sporco.

Estratto alcoolico: reazione fenolica mediocre.

Cane di 5 Kg.: fortissimi e tipici tremori diffusi, accompagnati da grave eccitamento psichico e da intense convulsioni tetaniformi; morte 20 ore dopo l' iniezione.

Autopsia: congestione lieve organi interni e del peritoneo.

5. Esper. - 20 *Novembre* 1904.

Patina cresciuta a 18°: sviluppo rapido e completo; odore speciale di tartuffi; feltro verde scuro; superficie inferiore bianco lattea.

Estratto alcoolico: reazione fenolica mediocre.

Cavia di 760 gr.: tremori e convulsioni tetaniformi gravi; muore 16 ore dopo l' iniezione.

6. Esper. - 7 *Gennaio* 1905.

a) Patina cresciuta a 18°: sviluppo un pò lento; odor di muffa; feltro verde scuro; superficie inferiore bianca.

Estratto alcoolico: reazione fenolica traccie.

Cavia 1. di 800 gr.: lievissimi tremori che scompaiono dopo 24 ore.

Cavia 2. di 400 gr.: tremori tipici; morte dopo 21 ore.

b) Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo assai lento e incompleto; lieve odore di muffa; feltro verde scuro, superficie inferiore bianca.

Estratto alcoolico: reazione fenolica traccie.

Cavia 1. di 700 gr.: tremori diffusi, ma senza convulsioni tetaniche e che cessano dopo 12 ore.

Cavia 2. di 500 gr.: tremori diffusi e lievi; morte dopo 29 ore.

Patina cresciuta a 18°: sviluppo rapido e completo; odor di muffa; feltro verde chiaro cinereo; superficie inferiore bianca.

Estratto alcoolico: reazione fenolica quasi nulla.

Cavia 1. di 750 gr.: intensi tremori e convulsioni tetaniche; morte dopo 2 ore.

Cavia 2. di 600 gr.: intensi tremori e convulsioni tetaniche; morte dopo 3 ore.

8. Esper. - 2 *Luglio* 1905.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo lento e incompleto; lieve odor di muffa; feltro verde chiaro; superficie inferiore bianco sporco.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cavia 550 gr.: nessun fenomeno di intossicamento.

Cane di 7050 gr.: nessun fenomeno di intossicamento.

9. Esper. - 15 *Settembre* 1905.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo rapido e completo; odor speciale di tartuffi; feltro verde scuro; superficie inferiore bianca.

Estratto alcoolico: reazione fenolica tipica e intensa.

Cavia di 650 gr.: tremori e convulsioni tetaniche intense; morte dopo 40 ore.

10. ESPER. - 7 *Novembre* 1905.

Patina cresciuta a 18°: sviluppo rapido e completo; odor gradevole di muffa; feltro verde chiaro bleuastro; superficie inferiore bianca.

Estratto alcoolico: reazione fenolica traccie.

Cavia 700 gr.: tremori e convulsioni tetaniche fortissime; morte dopo 5 ore.

VARIETÀ IV. - Penicillo isolato il 1 *Agosto* 1904, avente, al momento dell'isolamento, una patina con feltro di color verde gialliccio e una superficie inferiore di color arancio chiaro. Fonde la gelatina rapidissimamente.

ESPER. - 1 *Settembre* 1904.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo rapido e normale; inodora; feltro di color verde gialliccio; superficie inferiore di color giallo arancio chiaro.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla (l'estratto ha i colori dell' iride).

Cane di 8500 gr.: nessun fenomeno di intossicamento.

Cavia di 600 gr.: nessun fenomeno di intossicamento.

2. ESPER. - 29 *Ottobre* 1904.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo rapido e normale; inodora; feltro di color verde gialliccio; superficie inferiore di color giallo arancio chiaro.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla (l'estratto ha i colori dell'iride).

Cavia 1. di 600 gr.: nessun fenomeno di intossicamento.

Cavia 2. di 550 gr.: nessun fenomeno di intossicamento.

3. ESPER. - 7 *Dicembre* 1904.

Patina cresciuta a 18°: sviluppo un pò lento ma completo; inodora; feltro verde gialliccio; superficie inferiore bianca

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla (estratto alcoolico iridescente).

Cavia di 650 gr.: nessun fenomeno di intossicamento.

4. ESPER. - 4 *Febbraio* 1905.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo un pò lento, ma completo; inodora; feltro verde gialliccio; superficie inferiore bianca.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla (estratto alcoolico iridescente).

Cavia 1. di 700 gr.: nessun fenomeno di intossicamento.

Cavia 2. di 550 gr.: nessun fenomeno di intossicamento.

5. Esper. - 11 *Aprile* 1905.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo un po' lento ma completo; inodora; feltro verde gialliccio; superficie inferiore bianca.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla (estratto alcoolico iridescente).

Cavia 550 gr.: nessun fenomeno di intossicamento.

6. Esper. - 2 *Luglio* 1905.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo lento e incompleto; inodora; feltro di color cinereo; superficie inferiore bianca e mucilaginosa.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla (estratto iridescente)

Cavia di 580 gr.: nessun fenomeno di intossicamento.

7. Esper. - 15 *Agosto* 1905.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo rapido e completo; inodora; feltro grigio cinereo; superficie inferiore biauca.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla (estratto iridescente).

Cavia 1. di 650 gr.: nessun fenomeno di intossicamento.

Cavia 2. di 550 gr.: presenta lievi fenomeni di depressione e muore 3 giorni dopo l' iniezione.

8. Esper. - 15 *Settembre* 1905.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo rapido, tipico e completo; inodora; feltro verde gialliccio; superficie inferiore giallo arancio chiaro.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla (estratto iridescente).

Cavia 1. di 750 gr.: tremori tipici e convulsioni tetaniche che durano 24 ore circa: morte 40 ore dopo l' iniezione.

Cavia 2. di 550 gr.: tremori e convulsioni tipiche; morte dopo 25 ore.

9. Esper. - 22 *Novembre* 1905.

Patina cresciuta a 18°: sviluppo rapido e normale; inodora; feltro verde cinereo chiaro; superficie inferiore color rosso mattone chiaro.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla (estratto iridescente).

Cavia 1. di 700 gr.: nessun fenomeno di intossicamento.

Cavia 2. di 650 gr.: nessun fenomeno di intossicamento.

TABELLA riassuntiva delle diverse fasi di attività tossica delle 4 varietà *Penicillum Glaucum* su descritte.

Risultato delle prove	Epoche in cui fu esperimentato il potere tossico del parassita – 1904												1905												Epoche in cui fu isolato il parassita
	Genn.	Febbr.	Marzo	Aprile	Maggio	Giugno	Luglio	Agosto	Settem.	Ottobre	Novem.	Dicem.	Genn	Febbr.	Marzo	Aprile	Maggio	Giugno	Luglio	Agosto	Settem.	Ottobre	Novem.	Dicem.	
I.ª Varietà					D.	D.1	D.			D.	TD	D.	D.1	O.		O.		D.	D.	T.	T.		D.		5 Maggio 1904
II.ª id.					T.	T.	T.		T.	T.1	T.1			D.		O.		T.1	T.1	O.	O.		D.1		5 Maggio 1904
III.ª id.		O.	O.		O.			T.			T.	O.	T.1			T.			O.		T.		T.		6 Genn. 1904
IV.ª id.									O.	O.		O.		O.		O.			O.	O.	T.		O.		1 Agosto 1904

N. B. Gli effetti ottenuti dalle iniezioni degli estratti delle patine cresciute nei vari mesi dell' anno sono nella tabella indicati

con T. - che corrisponde ad un' azione tossica eccitante e tetaniforme:

» T l. - id. id. lievemente eccitante e tetaniforme;

» D. - id. id. deprimente;

» D,l. - id. id. deprimente lieve;

» O. - id. id. nulla. (fase atossica)

Come chiaramente appare dai risultati delle esperienze sopra esposte, e più ancora dalla tabella riassuntiva dei reperti ottenuti sugli animali mediante le iniezioni degli estratti alcoolici delle patine coltivate nelle varie epoche dell' anno, la proprietà che hanno i Penicilli di elaborare dei tossici specifici pellagrogeni è tutt' altro che costante.

Nel corso di circa due anni, infatti, le singole varietà da me studiate hanno presentato, e di solito anche più di una volta e a brevi periodi di distanza, delle notevoli variazioni non solo nell' intensità dei tossici da loro elaborati, ma pur anco nella natura dei medesimi; per quanto il materiale di coltura sia sempre stato mantenuto scrupolosamente invariato.

Riguardo al grado d' intensità dei tossici elaborati noi vediamo d' ordinario, durante il periodo di tempo di un anno, un continuo succedersi e alternarsi di fasi, nelle quali la produzione del tossico, per intensità e quantità, ora raggiunge il suo massimo grado, ora diminuisce o scompare anche del tutto.

Dei Penicilli p. es. che per un determinato periodo di tempo di 2-3 mesi e più ci dànno di continuo dei tossici potentissimi, ora di natura deprimente e paralizzante, e capaci perciò di uccidere gli animali anche in brevissimo periodo di tempo e con sintomi più tipici che si possano immaginare; in seguito, come vedesi nelle varietà I. e II. qui descritte, ora danno dei tossici assai attenuati e poco caratteristici, di modo che anche in dosi più elevate di prima non arrivano a determinare la morte di animali della stessa specie e dello stesso peso, come non arrivano a determinare in questi dei sintomi tipici e propri dei tossici pellagrogeni da me più volte descritti; ora infine perdono completamente anche questo potere di elaborare dei tossici e appaiono perciò innocui.

Non è un fonomeno dovuto ad un'attenuazione del parassita nel senso comune della parola, come potrebbe sembrare, questa diminuzione o scomparsa dell' attività tossica; giacchè, ripeto, le fasi di attività tossica massima e minima si succedono e si alternano più volte nel periodo di un anno e spesso anche in un modo abbastanza regolare e ritmico; sebbene la durata di queste due fasi varii di solito alquanto tra varietà e varietà del parassita stesso.

Dal complesso delle molteplici osservazioni di questi ultimi anni, su tutti i campioni di Penicilli che posseggo, sembra fin d' ora risultare che per questi parassiti il ciclo biologico sia alquanto più complesso di quello che si potea supporre in base alle prime osservazioni; giacchè le suddette fasi di attività tossica massima e minima appaiono costituite di due tipi ben diversi, vale a dire, di quelle che sono in diretto rapporto colle diverse stagioni dell' anno, e di quelle che invece per le quali questo rapporto non risulta affatto; mentre, ripeto, tanto le une che le altre sono affatto indipendenti dal mezzo colturale sul quale i parassiti si sviluppano.

Le fasi che si presentano in rapporto colle stagioni dell' anno, sono quelle che finora ho potuto meglio determinare e, come già feci osservare nelle mie prime due note precedenti, corrispondono a quelle da me già descritte per gli Aspergilli.

Durante l' inverno questi ifomiceti, se anche fatti crescere a una temperatura che corrisponda a quella del loro *optimum* di sviluppo (17°-18°), di solito presentano un'attività tossica minima o nulla; mentre invece nella primavera tale attività raggiunge il suo massimo grado. Durante l' estate però, e più precisamente nei periodi più caldi, l'attività tossica non di raro diminuisce ancora, fino anche a scomparire, analogamente a quanto si osserva in alcuni mesi invernali, per poi riapparire di bel nuovo durante l' autunno, dotata a un dipresso dello stesso grado che avea durante la primavera.

La fase estiva di attività tossica minima fu da me constatata in moltissimi dei Penicilli della mia collezione, in modo speciale nel 1905, e precisamente nei mesi di Giugno e Luglio, durante i quali la temperatura nei nostri laboratorî oscillò per più giorni sui 38°-39° e raggiunse anche i 40°; mentre nell' anno precedente, sia pel numero più scarso di osservazioni, sia perchè la temperatura della stagione non fu così eccessiva, questa fase di attività tossica minima estiva era passata quasi inosservata. Invece la fase di attività tossica minima invernale fu, in molti campioni almeno, constatata sia durante il 1904, sia durante il 1905, sebbene in grado spesso diverso per le singole varietà di Penicilli. Per quanto quindi l' esistenza d' una fase di attività minima estiva non sia ancor stata confermata per due anni, tuttavia il numero complessivo delle mie osservazioni in proposito è tale ch' io mi credo autorizzato in base ad esse di affermare, almeno in termini molto generali, che nelle nostre condizioni di clima le fasi di attività tossica massima negli ifomiceti in discorso possone essere due; una primaverile e l'altra autunnale, come due possano essere le fasi di attività tossica minima, una invernale e l' altra estiva.

A queste fasi, ripeto, noi dobbiamo però dare un significato molto generico; giacchè non di raro si osservano, come si vedrà meglio nel mio lavoro completo sul ciclo biologico dei Penicilli, varietà che in determinate condizioni possono dare dei tossici potentissimi anche nell' inverno ed estate; come si osservano di quelle che appaiono del tutto innocue sia nella primavera che nell' autunno.

Faccio infine osservare che a queste fasi di attività tossica massima e minima in rapporto alle stagioni dell' anno e desunte da ripetute riprove sui parassiti, corrispondono esattamente i risultati ottenuti dalle prove del potere patogeno degli stessi parassiti eseguite subito dopo il loro isolamento sia da farine infette, sia dall' atmosfera dei diversi ambienti. Come dissi brevemente infatti più sopra nella prima parte riassuntiva

generale di questa memoria i Penicilli risultarono tossici al momento del loro isolamento prevalentemente durante la stagione calda e più precisamente durante la primavera inoltrata e l'autunno; mentre durante l'inverno questi ifomiceti apparvero prevalentemente dotati o di proprietà tossiche minime oppure del tutto innocui.

Su questo fatto, che corrisponde perfettamente a quanto già avea osservato per l' *Aspergillus Fumigatus*, richiamo l' attenzione in modo particolare; giacchè, secondo me, costituisce la più bella riprova che trattasi realmente di un vero fenomeno biologico legato alle stagioni dell'anno e non già ad altre cause, come per es. al mezzo colturale (patate ecc.) su cui i parassiti vennero conservati durante il periodo di osservazione.

Il secondo tipo di fasi di attività tossica massima e minima, come dissi più sopra, sarebbe caratterizzato da lunghi periodi in cui il parassita si mantiene ora dotato di proprietà tossiche, soggette alle variazioni su indicate e in rapporto alle diverse stagioni, ora invece si mantiene perfettamente innocuo o quasi in qualsiasi epoca dell' anno.

Le due ultime varietà su descritte, specialmente la IV., ci dànno un' idea abbastanza esatta di questi lunghi periodi di inattivita tossica dell' ifomiceta e indipendenti dalle stagioni dell' anno: di esse infatti la prima (Varietà III) rimane innocua dal Gennaio all'Agosto 1905; mentre la seconda (Varietà IV.) lo rimane per un'anno, cioè dal Settembre 1904 al Settembre 1905.

Siccome poi ho anche osservato delle varietà di Penicilli che, mentre apparvero dotate di potere tossico per un periodo di un anno e più, si presentarono invece nell' anno successivo costantemente innocue; così si potrebbe pensare in questo caso a uno stato di esaurimento del parassita che molto probabilmente avviene non solo in vitro, ma anche in natura e che è legato forse a condizioni speciali del suo ciclo biologico.

A ogni modo si tratterebbe sempre d' un esaurimento solo della proprietà di elaborare dei tossici; giacchè i parassiti durante questa fase crescono rigogliosi; sporificano in modo normale; conservano i loro colori tipici più o meno vivaci come nella fase di attività tossica, nè presentano fin qui alcune notevoli modificazioni negli altri caratteri botanici. Questo fatto credo che abbia contribuito non di poco a trarci in sul principio in inganno e a farci pensare che le varietà osservate nelle suddette condizioni fossero realmente da considerarsi come innocue in qualsiasi periodo della loro evoluzione. Le *fig. 9* e *10* della Tav. qui annessa riproducono la III. Varieta su descritta nelle sue fasi di inattivita e attività tossica e indipendenti dalle stagioni dell' anno.

Qualunque sia la causa di questa periodicità tossica del parassita, ho voluto accennare ad essa fin d' ora per l' importanza che presenta nel campo biologico e pel valore che forse potrà avere nell' interpretazione della diffusione della pellagra, e dei periodi di recrudescenza che in determinate annate si notano in questa malattia.

Mi riservo perciò più tardi, a studio più completo, di ritornare su questo importante argomento.

Se per questi lunghi periodi di inattività tossica non abbiamo alcun dato ancora che ci permetta di investigare la causa e la natura dei medesimi; invece dei dati non ci mancano per caratterizzare le fasi biologiche annuali di attività tossica massima e minima che sono in rapporto colle stagioni. Queste ultime fasi, infatti, sono accompagnate da tali variazioni di alcuni caratteri botanici del parassita, che per la loro costanza e per la loro natura mi par che meritino d' esser note fin d' ora; molto più che ci possono servire, io credo, per valutare e interpretare lo stesso fenomeno biologico in discorso, il quale dopo tutto forma l' oggetto principale dell' attuale memoria.

Voglio qui brevemente accennare al modo più o meno rigoglioso con cui si sviluppano questi ifomiceti, all' aspetto generale delle loro patine, non che alle variazioni che si succedono nel color tipico del feltro e della superficie inferiore della patina. Solo in linea secondaria voglio accennare ancora alle variazioni che avvengono nell' odore tipico emanato da questi ifomiceti e infine alle variazioni che avvengono nella proprietà che molti di essi posseggono di elaborare dei prodotti fenolici contemporaneamente ai tossici specifici.

Anzi tutto i parassiti durante le fasi di attività tossica minima sia invernale, sia estiva, si sviluppano in generale più lentamente del solito e meno rigogliosi; di modo che, mentre nelle fasi di attività tossica massima impiegano di solito 4-5 giorni a dare una patina rigogliosa e completamente sporificata, invece nelle altre fasi impiegano 7-8-10 e perfino 20 giorni e più a crescere e a sporificare. Inoltre la patina nei periodi di inattività tossica è più grossa, più carnosa e d' aspetto più mucilaginoso del solito.

I colori tipici del feltro dei così detti Penicilli verdi, che durante il periodo di attività tossica sono vivaci e caratteristici per ogni singola varietà, invece durante il periodo di inattività invernale e estiva perdono la loro tipica vivacità, diventano sbiaditi, più chiari del solito e tendono ad assumere un tipo unico di verde cinereo con chiazze biancastre, miste anche non di raro a traccie di color giallo sporco.

Il colore della superficie inferiore della patina (ora bianca, ora gialla nelle sue diverse gradazioni, ora di color marone ecc.), pure caratteristico delle singole varietà dei Penicilli verdi, durante la fase di inattività tossica assume invece di solito tinte più cariche e più oscure e perde in qualche caso anche perfino il suo tono originale.

Così p. es. le patine di color giallo limone chiaro possono diventare di color rosso vinoso oppure nerastro e quelle di color giallo arancio possono diventare di color giallo ocra più o meno scuro.

Dalle *fig. 1, 2, 3* e *4* nonchè dalle *fig. 5, 6, 7* e *8* della Tav. qui annessa, rappresentanti fedelmente le patine delle varietà I. e II. su descritte nelle loro diverse fasi di attività tossica in rapporto colle stagioni dell'anno, si può farsene un concetto abbastanza esatto di queste variazioni di colori.

L' odore tipico dei Penicilli cambia pure non di raro, specialmente nella sua intensità, a seconda se il parassita si trova nella sua fase di attività tossica o no. Di solito l' odore è più carattaristico, più intenso e penetrante durante la fase di tossicità massima; è invece lieve e meno caratteristico e diventa spesso anche nauseante, assumendo per il più il carattere di odore di verdure, specialmente di cavoli in putrefazione, durante le fasi inattive invernali ed estive.

Vi sono però varietà che si mantengono inodore o quasi in tutte le varie fasi; come esistono varietà che anche durante le diverse fasi ora emanano odor gradevole di tartuffo, ora odor di fungo mangiareccio, ora odore di gaz illuminante assai intenso, ora infine odor comune di muffa. Vedrò in seguito con maggior numero di ossservazioni quale può essere il vero significato anche di queste variazioni e i possibili loro rapporti coll' attività tossica del parassita.

La proprietà che hanno molti Penicilli, al contrario degli Aspergilli, almeno delle varietà da me studiate [1] di elaborare dei prodotti fenolici che reagiscono al cloruro ferrico, ha pure non di raro dei rapporti abbastanza diretti colle suddette fasi tossiche e atossiche. I Penicilli generalmente producono una maggior quantità dei suddetti fenolici durante il periodo di attività tossica massima, e più precisamente quando il tossico da loro elaborato ha proprietà convulsivanti; mentre durante i periodi di attività tossica minima la produzione dei fenoli si riduce alquanto o finisce anche per scomparire.

[1] Recentemente però il Gosio (La reazione fenolica del granoturco ecc. *Rivista pellagrologica ital.* N. 1 1906) avrebbe osservato che anche gli Aspergilli e precisamente l' *Aspergillus Flavescens* e il *Varians* sono capaci di produrre e in gran copia « i composti tipici nel modo di reagire col cloruro ferrico »; mentre questo reattivo da me pure usato sugli estratti aspergillari nelle ripetute riprove diede sempre risultati negativi. Dati questi risultati così diversi ottenuti collo stesso metodo da me e dal Gosio, specialmente sull' *Asper. Varians,* sarebbe ora importante di sapere se le ricerche del Gosio furono fatte sulla medesima varietà di Aspergillo da me di recente descritta, o se pure furono fatte, come è più probabile, sull'*Asp. Varians* Whemer affatto diverso dal mio e che il Dott. Tiraboschi, collaboratore del Gosio nei Laboratori della Sanità Pubblica, avrebbe isolato dal *mais* guasto, « *Annali di Botanica* Vol. II. Fasc. I. ».

Ciò servirebbe a stabilire se la discrepanza tra i miei reperti e quelli del Gosio, che in tal caso almeno non si può attribuire alla diversità del metodo di ricerca, si debba ricercare nella diversa specie o varietà dell' ifomiceta su cui si è sperimentato o se invece si debba ricercare nelle fasi biologiche diverse, durante le quali furono studiati i medesimi ifomiceti. Non sarebbe da meravigliarsi infatti che gli Aspergilli si comportassero anche nella produzione dei composti fenolici analogamente ai Penicilli; pei quali ultimi noi abbiamo appunto dimostrato che non tutte le varietà reagiscono nello stesso modo al cloruro ferrico e che di più

Anche questo rapporto è però tutt' altro che costante; giacchè noi vediamo spesso dei Penicilli tossici o innocui ma eminentemente fenolici, i quali più avanti e in altre epoche dell' anno invece ci forniscono degli estratti alcoolici fortemente dotati di proprietà tossiche tetaniche, ma che non danno alcuna reazione col cloruro ferrico.

Moltissimi poi sono stati i Penicilli dotati di proprietà tossiche sia deprimenti, sia tetaniche che finora non diedero mai alcuna traccia della suddetta reazione fenolica (Vedi p. es. le varietà I. II.); come non mancarono quelli i di cui estratti diedero un' intensa reazione fenolica, mentre erano affatto sprovvisti di qualsiasi proprietà tossica.

Sulla presenza della tipica reazione fenolica in estratti di Penicilli che poi sugli animali apparvero perfettamente innocui, insisto in modo singolare perchè è questa, secondo me, la prova più eloquente che si tratta in realtà di due principî diversi, al contrario di quanto ammise il Gosio, e come apparirà ancor meglio in una nota apposita. Per ora mi basti di poter affermare che il rapporto tra la proprietà tossica e quella di elaborare dei prodotti fenolici che reagiscono al cloruro ferrico è pure tutt' altro che costante anche per gli stessi Penicilli; il che dimostra una volta ancora come la classica reazione fenolica non possa avere una grande importanza diagnostica nella ricerca dei tossici pellagrogeni.

ancora la medesima varietà può comportarsi verso questa reazione in modo diverso ed opposto a seconda della fase biologica in cui si trova. Notisi che la diversità delle due suddette specie di *Aspergillus Varians* mi fu confermata di recente anche dallo stesso Tiraboschi in una sua gentilissima del 12-2-'06, in seguito ad esame di confronto del nuovo parassita da me descritto e da lui richiestomi circa due mesi prima. Mi permetto di far rilevare questo fatto, perchè si possa dare una giusta interpretazione alle parole del Gosio, il quale nella sopra accennata nota sembra voglia far credere che la specie di *Aspergillus Varians* non possa essere che una sola, quella naturalmente sulla quale egli ha eseguito le sue ricerche.

Il Gosio, che mi accusa di giudizii gratuiti perchè affermai che l'*Asper. Varians* da me illustrato non produce fenoli riconoscibili alla classica reazione, pur essendo esso dotato di proprietà tossiche potentissime, dovrà quindi riconoscere che le nostre divergenze sulla presenza o no di composti fenolici negli estratti dei parassiti pellagrogeni non sono poi così enormi e di così gravi conseguenze, come egli vorrebbe far supporre; giacchè vediamo che queste si possono benissimo spiegare, finora almeno, anche basandosi solamente sui risultati ottenuti colla reazione al clururo ferrico, alla quale egli pure, non ostante la grande competenza, in materia che si vuole appropriare, fin qui si è limitato, senza ricorrere a quelle ricerche più rigorose e di primo ordine a cui accenna e che, come egli dice, sarebbe troppo pretendere da me.

Mi riservo del resto di tornare sull' argomento dopo un opportuno esame di confronto della specie di Aspergilli studiati dal Gosio e del Tiraboschi e che hanno la proprietà di dare dei composti fenolici che reagiscono al cloruro ferrico.

In attesa pertanto della nuova luce che porterà il Gosio nella ricerca dei composti fenolici nei parassiti vegetali, continuerò, nel limite delle mie forze, il lavoro seguendo la via che mi sono prefisso e colla speranza soltanto che il modesto contributo dell' opera mia possa un giorno esser di qualche vantaggio all'umanità sofferente. Intanto osservo con piacere che ora il Gosio va limitando

Rimane ora a dire delle variazioni che avvengono nella natura dei tossici stessi e da me ormai constatate nella massima parte dei 61 campioni di Penicilli verdi che formano oggetto di questi studi.

Anche questi ifomiceti, analogamente a quanto già dimostrai per la nuova specie di *Aspergillus Varians* da me di recente descritta, e come appare evidente dal riassunto delle esperienze sulla I. e II varietà sopra esposta, possono alternativamente elaborare dei tossici ora dotati di proprietà eccitanti e convulsivanti, ora dotati di proprietà deprimenti e paralizzanti

Germi che per 4-5 mesi di fila e anche per un'anno e più avevano dato soltanto dei tossici di natura o convulsivante o deprimente, in seguito entrarono infatti in un' altra fase, elaborando tossici di natura diversa ed opposta alla prima, cioè elaborando tossici o deprimenti o convulsivanti. Queste fasi ora sono brevi, ora, ripeto, sono lunghe e possono durare anche un anno e più, e il passaggio dall'una all'altra fase avviene direttamente, oppure invece, e più di frequente, avviene dopo un periodo di 1–3 mesi e più di assoluta inattività tossica.

Nessun altro dato importante posseggo finora su questo passaggio dall' una all' altra fase di attività tossica, sia rispetto alle eventuali modificazioni che possono avvenire nei caratteri botanici del fungo, sia riguardo ai loro rapporti colle varie epoche dell' anno. Solamente a tale proposito faccio rimarcare ancora come questi passaggi nel caso mio furono sempre indipendenti dal mezzo colturale su cui il parassita si era sviluppato, e solo da ricerche continuate su vasta scala sarà possibile stabilire se essi siano legati veramente a qualche legge biologica, o se invece dipendano da condizioni esteriori.

Intanto mi permetto qui richiamare l' attenzione sull' importanza di questo nuovo fenomeno nell' interpretazione di alcune questioni che riguardano l' endemia pellagrosa e rimaste finora insolute; come p. es. la prevalenza delle forme acute in alcune epoche dell' anno e le oscillazioni spesso notevolissime nei rapporti tra le forme acute e forme croniche che si hanno nelle diverse annate e nelle diverse zone pellagrogene. A tale proposito voglio ricordare per esempio come in tutto il 1905 al nostro Istituto non pervenne neppure un caso affetto da pellagra acuta (tifo pellagroso); mentre nell' anno precedente entrarono e morirono, tutti nel periodo di pochissimi giorni, 29 casi di tifo pellagroso.

il valore della classica reazione fenolica nella ricerca dei tossici pellagrogeni; come osservo con piacere ch' egli ora non insiste più oltre sulla questione principale delle nostre divergenze nell' etiologia della pellagra, vale a dire, sull' origine extra-parassitaria dei tossici pellagrogeni da lui prima con tanta abilità e ardore sostenuta, riferendosi egli sempre ora a tossici contenuti nella spora o nel micelio del parassita. Solo mi dispiace che il Gosio a contributo di questa teoria nostra e del Di Pietro porti oggi come nuovi dei fatti (p. es. che le spore perdono il loro potere tossico germogliando) da noi da tre anni circa sostenuti e sui quali il Besta di recente, nel lavoro tanto citato dal Gosio stesso, è ritornato con nuove esperienze.

Volendo ora concludere in base ai fatti più importanti da me osservati in questi ultimi anni sul ciclo biologico dei Penicilli verdi, e suffragati da un numero così notevole di osservazioni, da rendere quasi indiscutibile il valore delle nostre affermazioni, dirò che noi dovremo in avanti considerare, assai probabilmente, come patogene tutte la varietà di questi ifomiceti, potendo essi attraversare dei periodi più o meno lunghi di attività tossica, come possono attraversare dei periodi più o meno lunghi durante i quali appaiono assolutamente, o quasi, sprovviste di ogni proprietà di elaborare dei tossici in qualsiasi epoca dell' anno.

Durante i periodi di attività tossica, di durata per ora ancora indeterminata, questi ifomiceti possono produrre alternativamente, ora dei principî tossici di natura eccitante e convulsivante, ora dei principî tossici di natura deprimente e paralizzante.

I periodi di attività tossica dei Penicilli sono caratterizzati da un alternarsi di fasi di attività massima e minima che sono in rapporto colle stagioni dell' anno.

Nelle nostre condizioni climatiche durante la primavera e l' autunno questi ifomiceti di solito raggiungono il massimo di tossicità; mentre durante l'inverno e i mesi più caldi dell'estate raggiungono il minimo di tossicità e possono diventare perfino innocui.

Queste fasi di attività tossica massima e minima, che sono in rapporto colle stagioni dell' anno, sono pure assai di sovante accompagnate da modificazioni notevoli dei principali caratteri fisiologici del parassita e specialmente dei colori tipici e caratteristici del feltro e della superficie inferiore della patina [1].

LAVORI CITATI NEL TESTO

Ceni 1. - Veleni degli Aspergilli *Fumigatus* e *Flavescens* e loro rapporti colla pellagra (In collabor. col Dott. Besta). *Rivista Sperimentale di Freniatria* Vol. XXVIII. F. IV. 1902. Ueber die Toxine von *Aspergillos Fumigatus* und A. *Flavescens* und deren Beziehungen zur pellagra *Centralbl. f. Algemeine Pathologie u. Pathologische Anatom.* XIII. Bd. 1902.

Id. 2. - Sulle proprietà patogene del *Penicillum Glaucum* nell' etiologia della pellagra. *Id.* 1903.

[1] In una prossima nota vedremo come oltre gli Aspergilli e i Penicilli, esistano altre specie di Ifomiceti dotati di proprietà tossiche e caratterizzati pure da un alternarsi di fasi biologiche presso a che uguali a quelle qui sopra descritte.

Ceni 3. - I Penicilli nell' etiologia e nella patogenesi della pellagra. (In collaborazione col Dott. Besta). *Id.* Vol, XXIX, f. 1903.
Id. 4. - Le proprietà tossiche dell' *Aspergillus Fumigatus* in rapporto colle stagioni dell' anno. *Zieglers Beiträge zur patol. Anatomie u. zur. allegem. Pathologie* 1904. Vedi anche: *Rivista sper. di Freniatria* Vol. XX. F. I. 1904.
Id. 5. - Nuove ricerche sulla pellagra nei polli. *Riv. sper. di Freniatria* Vol. XXX. 1904.
Id. 6. - Die pathogen Eigenschaften des *Aspergillus Niger* mit Bezug auf die Genese der pellagra. (In Collabor. col Dott. Besta) *Ziegler's Beiträge zur patologischen Anatomie u. z. allgemeine Pathologie;* 37. Band; 1904. Vedi anche: Le proprietà patogene dell' *aspergillus niger.* ecc, *Riv. Sper. di Fren.* Vol. XXX. 1904.
Id. 7. - Le proprietà tossiche di alcuni ifomiceti in rapporto colle stagioni e col ciclo annuale dell' endemia pellagrosa. *Atti dell' XI. Congresso della Società Freniatrica Italiana;* Genova 1904. Vedi anche *Rivista pellagrologica italiana:* 1904.
Id. 8. - Potere patogeno dell' *Aspergillus Ochraceus* e suo rapporto coll'etiologia e patogenesi della pellagra. *Rivista sper. di Fren.* Vol. XXXI 1905.
Id. 9. - Di alcuni caratteri biologici dei penicilli in rapporto colle stagioni e col ciclo annuale della pellagra. *Atti del III. Congresso della Società Italiana di patologia.* (Roma Aprile, 1905). *Lo sperimentale.* (*Archivio di biologia norm. e pat.*) 1905. Vedi anche *Rivista pellagrologica,* 1905.
Id. 10. - Nuovi concetti sull' etiologia e cura della pellagra. Conferenza tenuta alla Reale Società Italiana d' Igiene. Milano 16 Aprile 1905. *Giornale della R. Società Italiana d' Igiene.* N. 2. 1905.
Id. 11. - Di una nuova specie di *Aspergillus Varians* e delle sue proprietà patogene in rapporto coll' etiologia della pellagra. *Riv. sper. di Fren.* Vol. XXXI. 1905.

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA.

Le figure riproducono al naturale le principali variazioni avvenute nei colori tipici delle patine delle tre prime varietà di *Penicillum Glaucum* sopra descritte osservate durante il 1904 e il 1905 nelle varie loro fasi di attività tossica.

Germi coltivati su liquido Raulin.

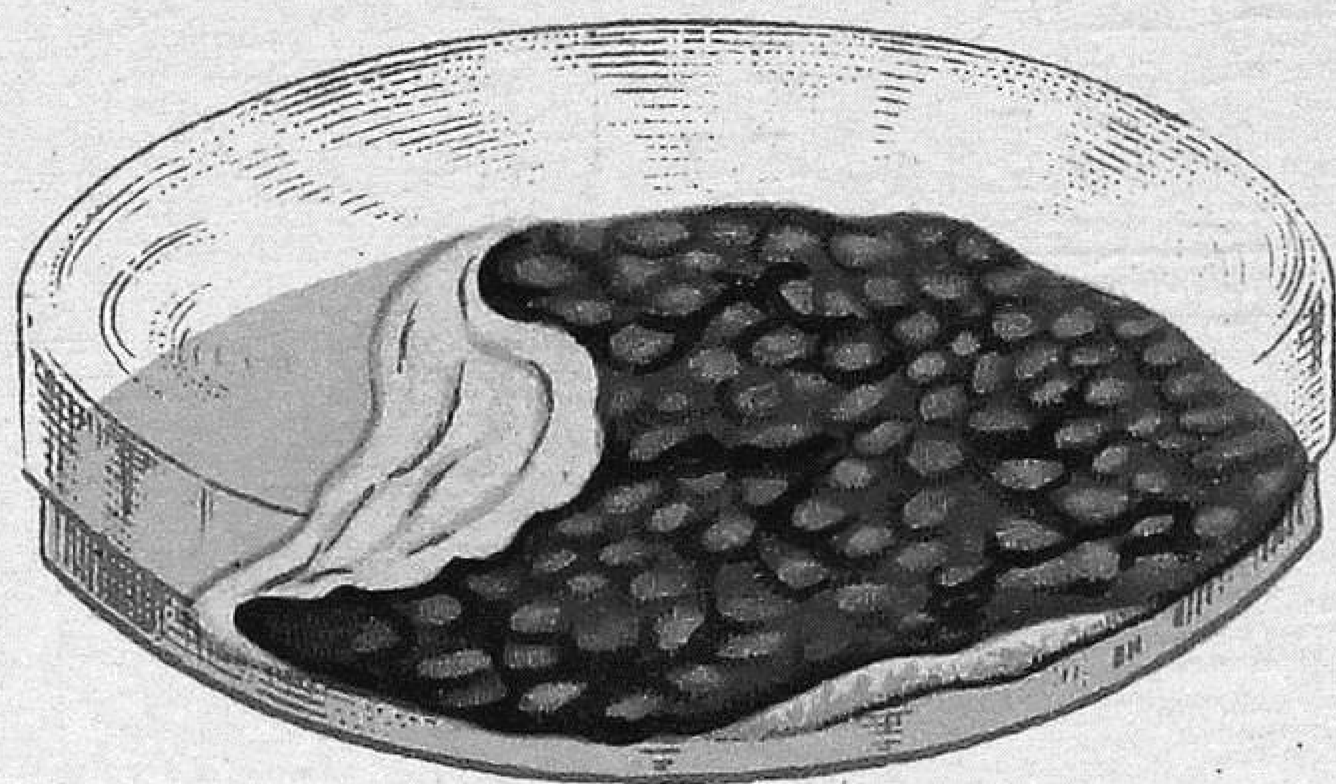
Le date qui sotto esposte e annesse al numero delle singole figure della tavola corrispondono all' epoca in cui fu riprodotta la patina e ne fu provato il potere tossico del parassita; mentre le tettere poste accanto indicano gli effetti ottenuti negli animali coll' iniezione degli estratti e che, come nella tabella riassuntiva intercalata nel testo, hanno il significato seguente:

T. effetti di un tossico di natura eccitante e tetanica.
D. effetti di un tossico di natura paralizzante e deprimente.
O. nessun fenomeno di intossicamento (parassita innocuo).

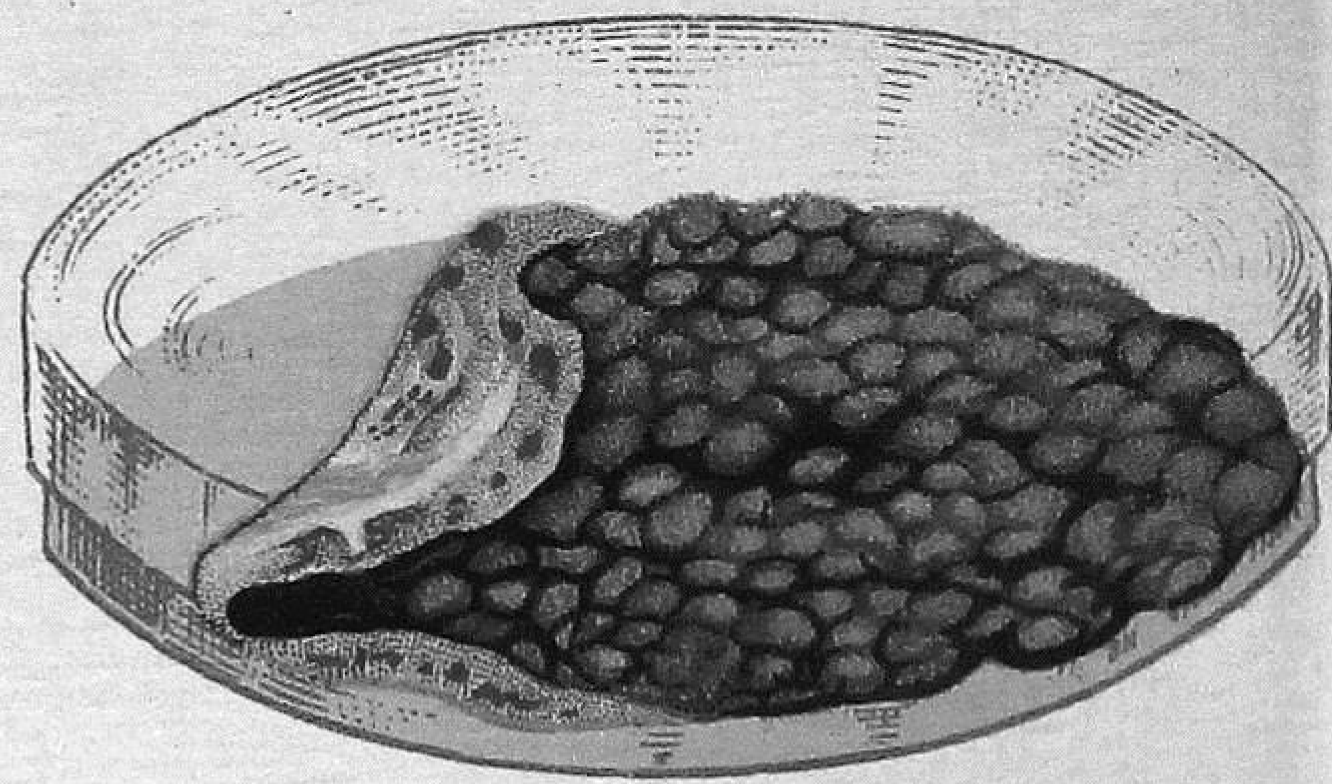
Varieta I. Fasi di attività tossiche in rapporto colle stagioni dell' anno.
Fig. 1. 27 Maggio 1904. = D.
Fig. 2. 1 Ottobre 1904 = D
Fig. 3. 9 Febbraio 1904 = O.
Fig. 4. 25 Agosto 1905 = T.

Varieta II, Fasi di attività tossica in rapporto colle stagioni dell' anno.
Fig. 5. 25 Maggio 1904 = T.
Fig. 6. 16 Dicembre 1904 = O.
Fig. 7. 6 Aprile 1905 = O.
Fig. 8. 1 Giugno 1905 = T.

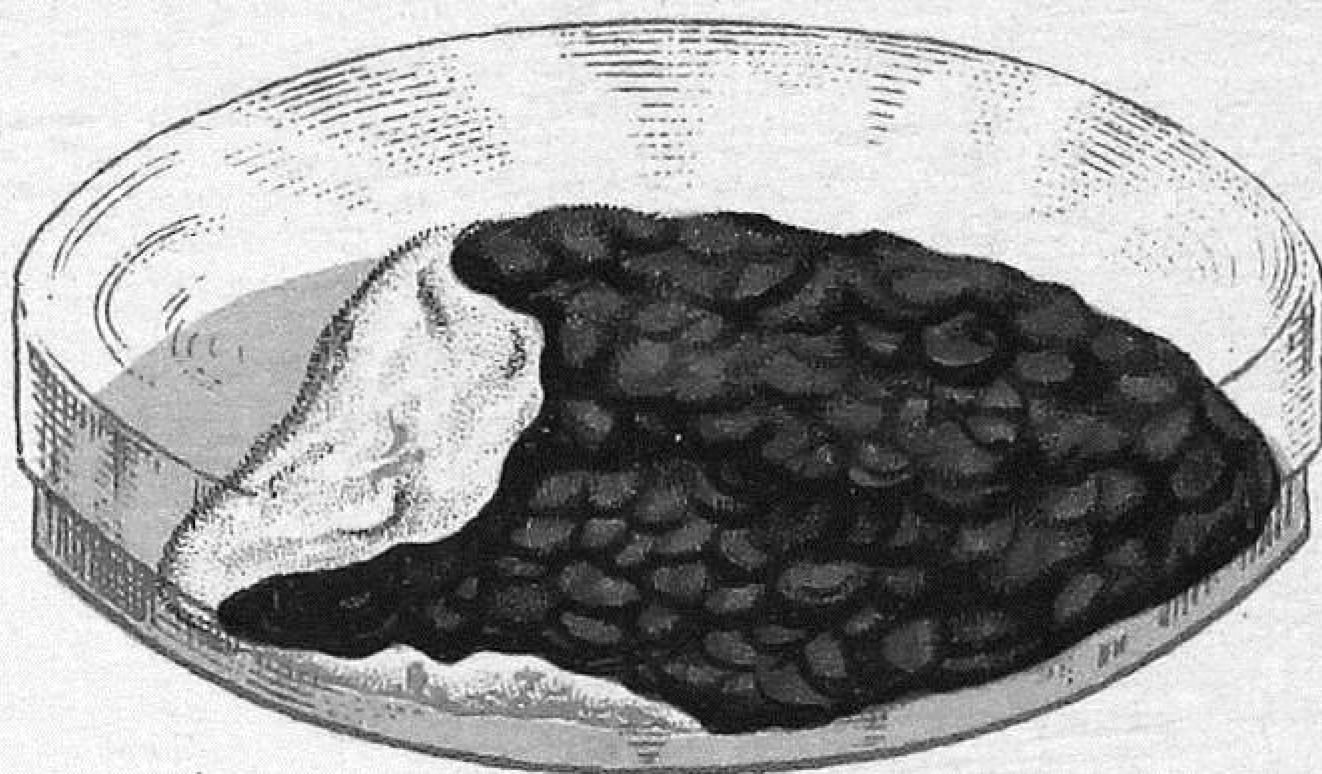
Varieta III. Fasi di attività tossica indipendenti dalle stagioni dell' anno
Fig. 9. 4 Maggio 1904 = O
Fig. 10. 22 Novembre 1905 = T.



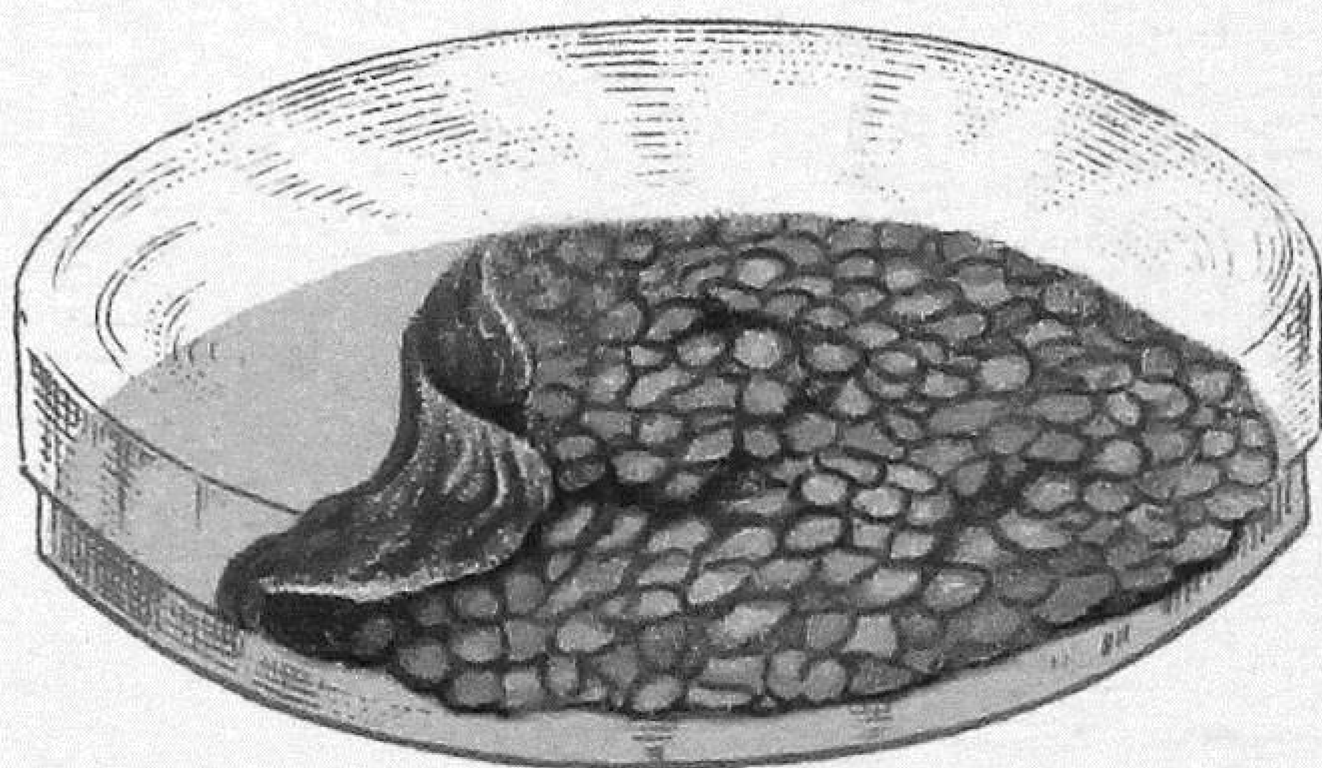
1



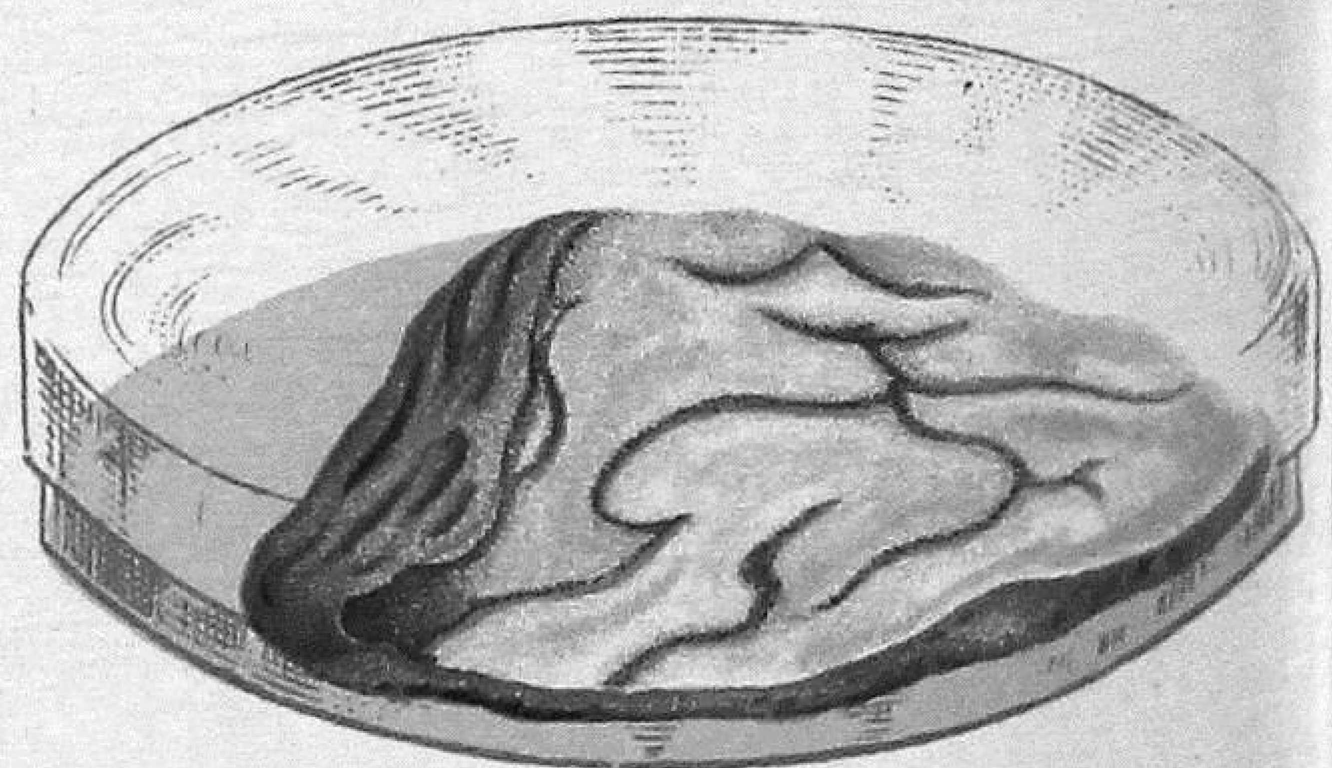
2



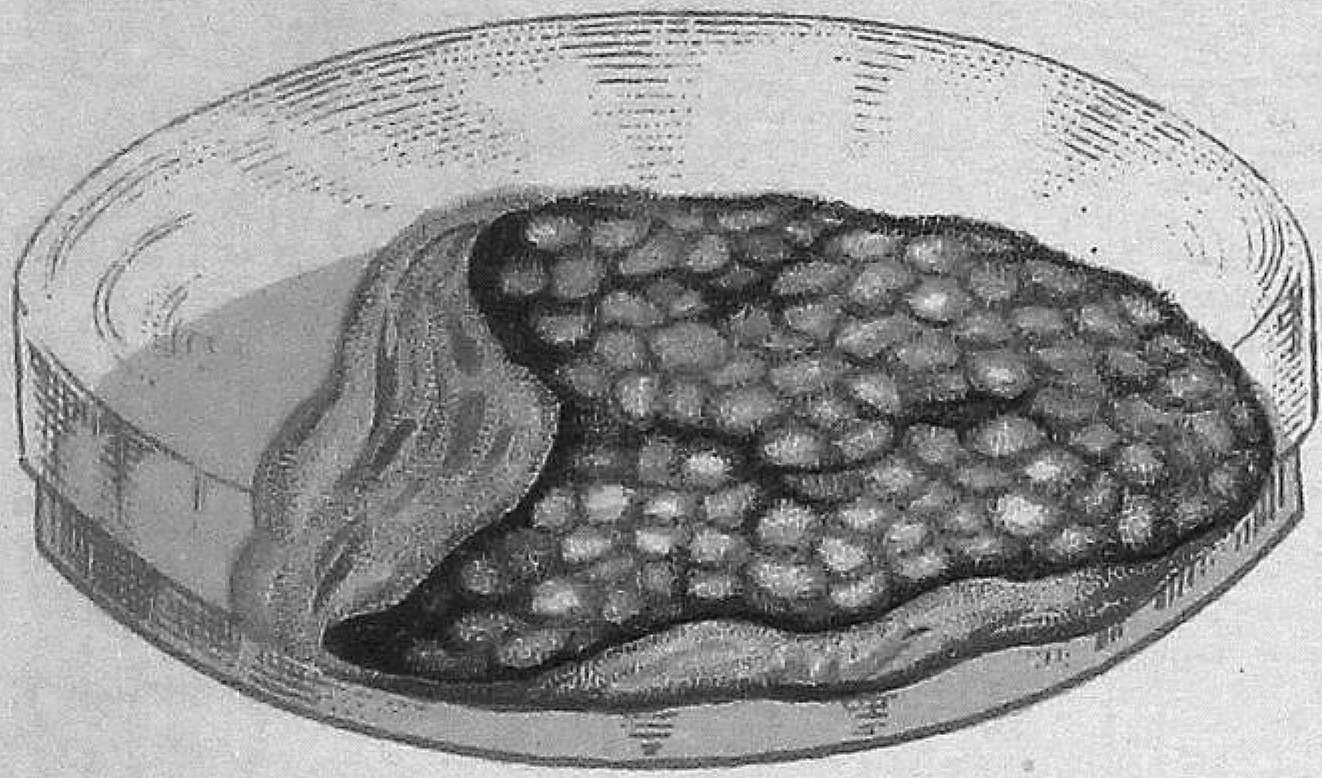
9



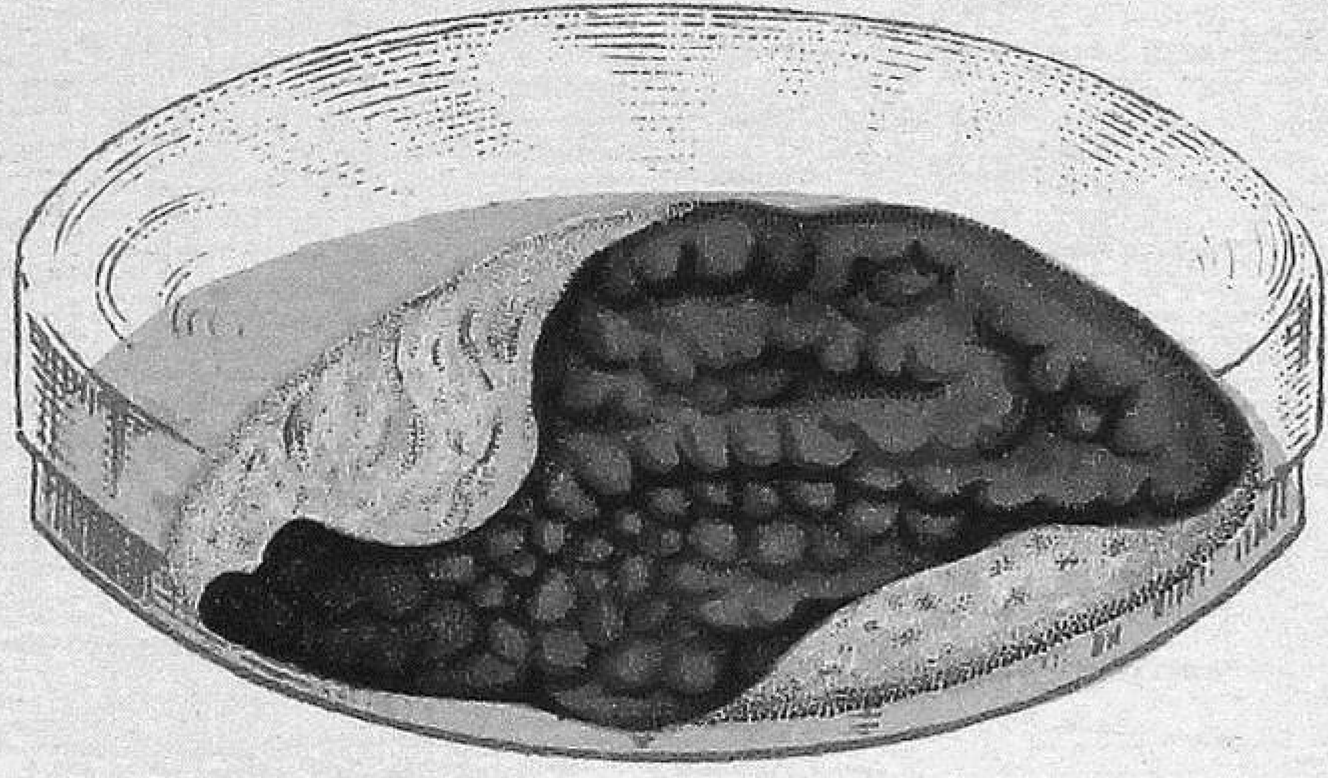
5



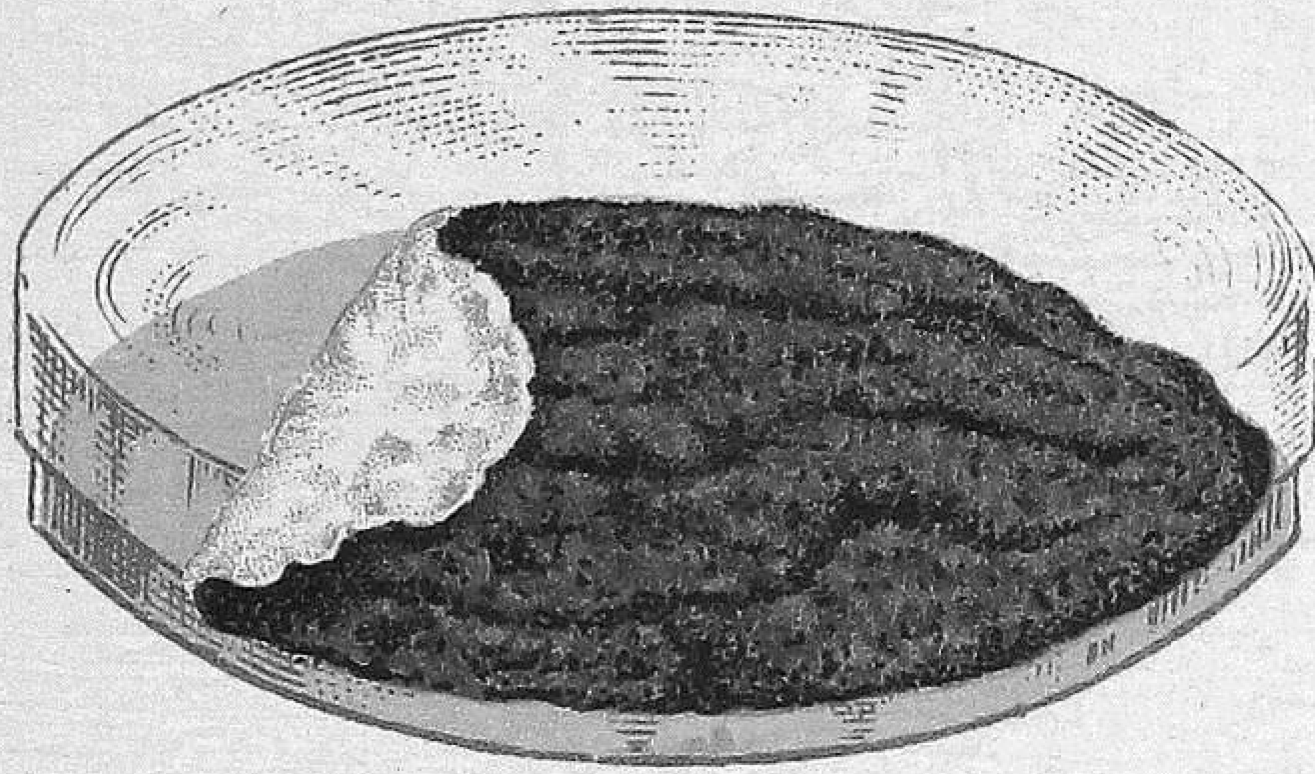
6



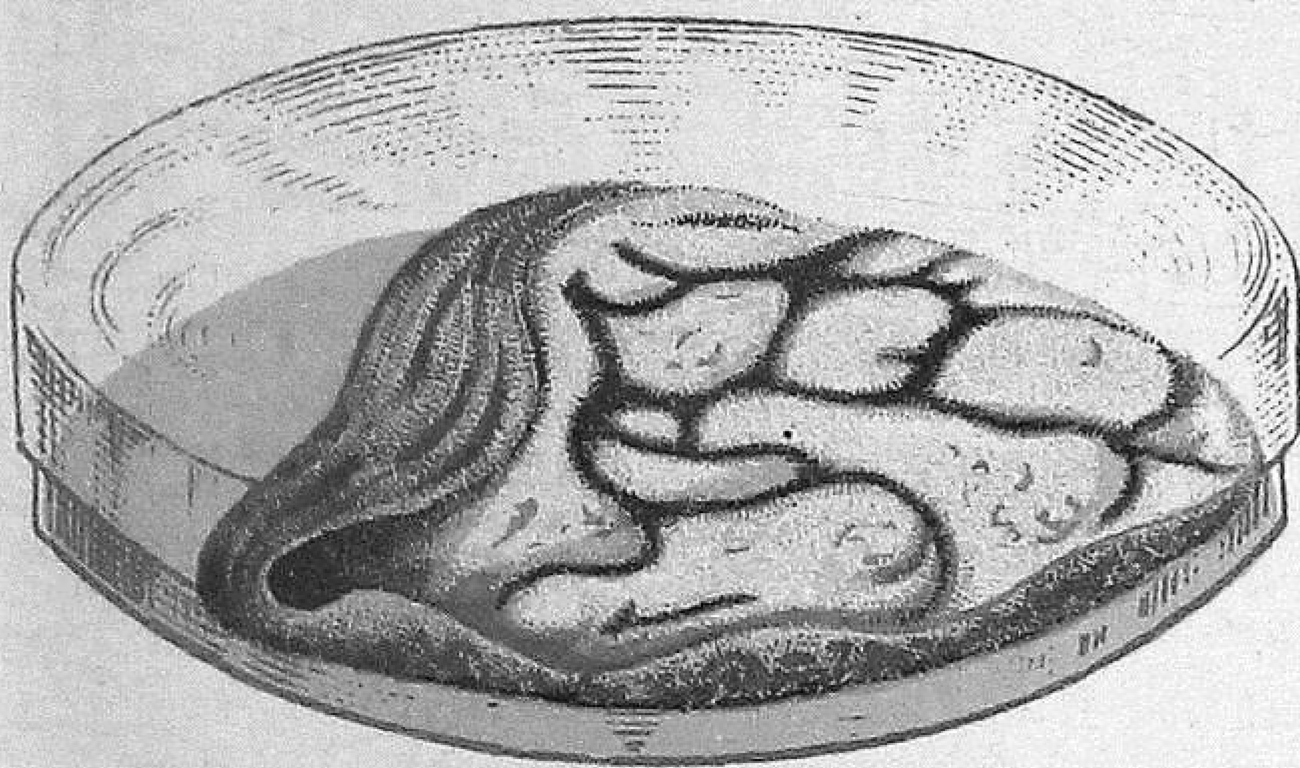
3



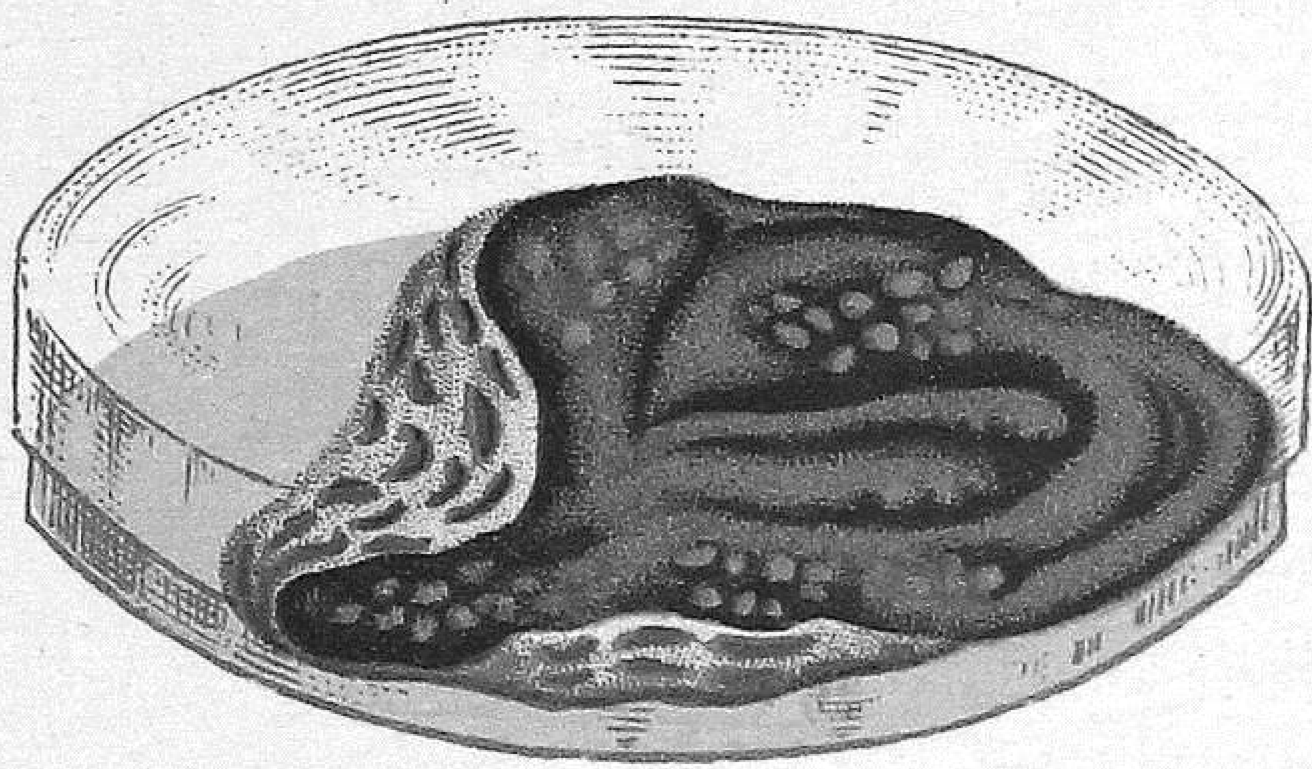
4



10



7



8

Tipo-Litografia A. Dal Re e C.i - Modena